

平成28年11月29日
石川県地場産業振興センター
アグリ技術シーズセミナー in 北陸「北陸の発酵技術の活用とその展開」

酵母識別DNAマーカーを有する 尿素非生産性清酒酵母の単離とその応用

新潟県醸造試験場
主任研究員

栗林 喬

本日のプレゼンテーションの内容

研究1.

- ▶ 酵母識別DNAマーカーを有する尿素非生産性清酒酵母の単離とその応用
(海外輸出に対応した清酒酵母の開発)

研究2.

- ▶ 淡麗な酒質に調和する高香気生産性酵母の開発

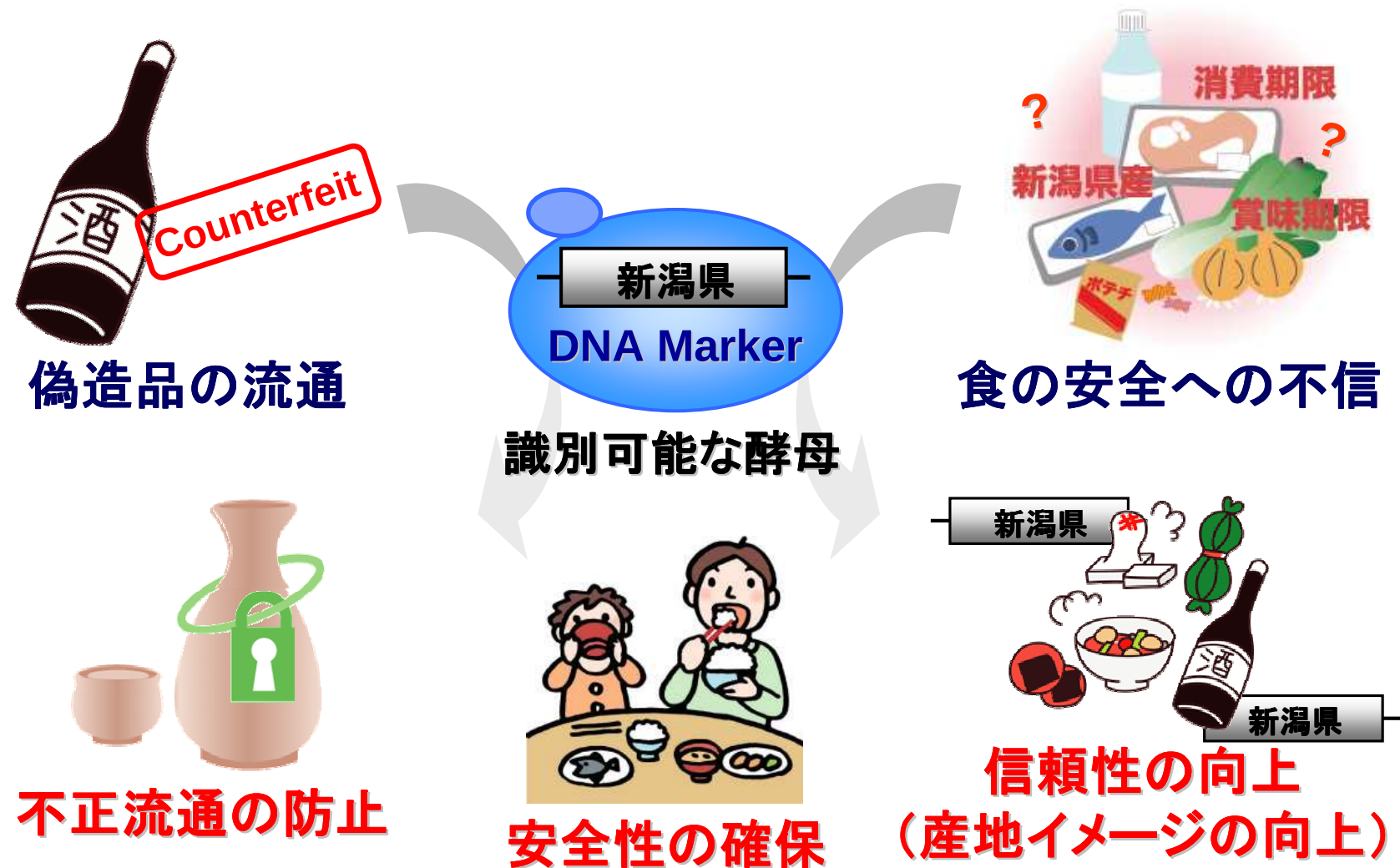
研究1.

- ▶ 酵母識別DNAマーカーを有する尿素非生産性清酒酵母の単離とその応用
(海外輸出に対応した清酒酵母の開発)

研究2.

- ▶ 淡麗な酒質に調和する高香気生産性酵母の開発

研究背景



目的：製造現場レベルで**実用可能な識別酵母**の開発

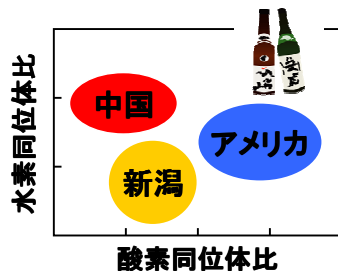
研究背景：業界ニーズ（問題点）と解決策

業界ニーズ（問題点）

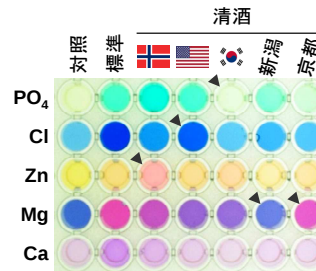
- ・偽造品流通 → 高度な識別法・偽装に対する抑止力
 - ・安全管理の強化 → 食の安心・安全を保証する体制
- 中小企業にとっては、まさに“足の裏の米粒”

解決法

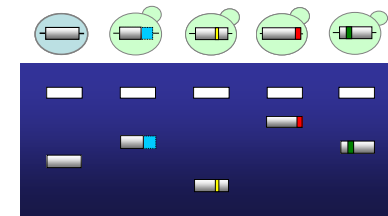
県内酒造場の清酒を科学的に識別する技術の確立



安定同位体分析



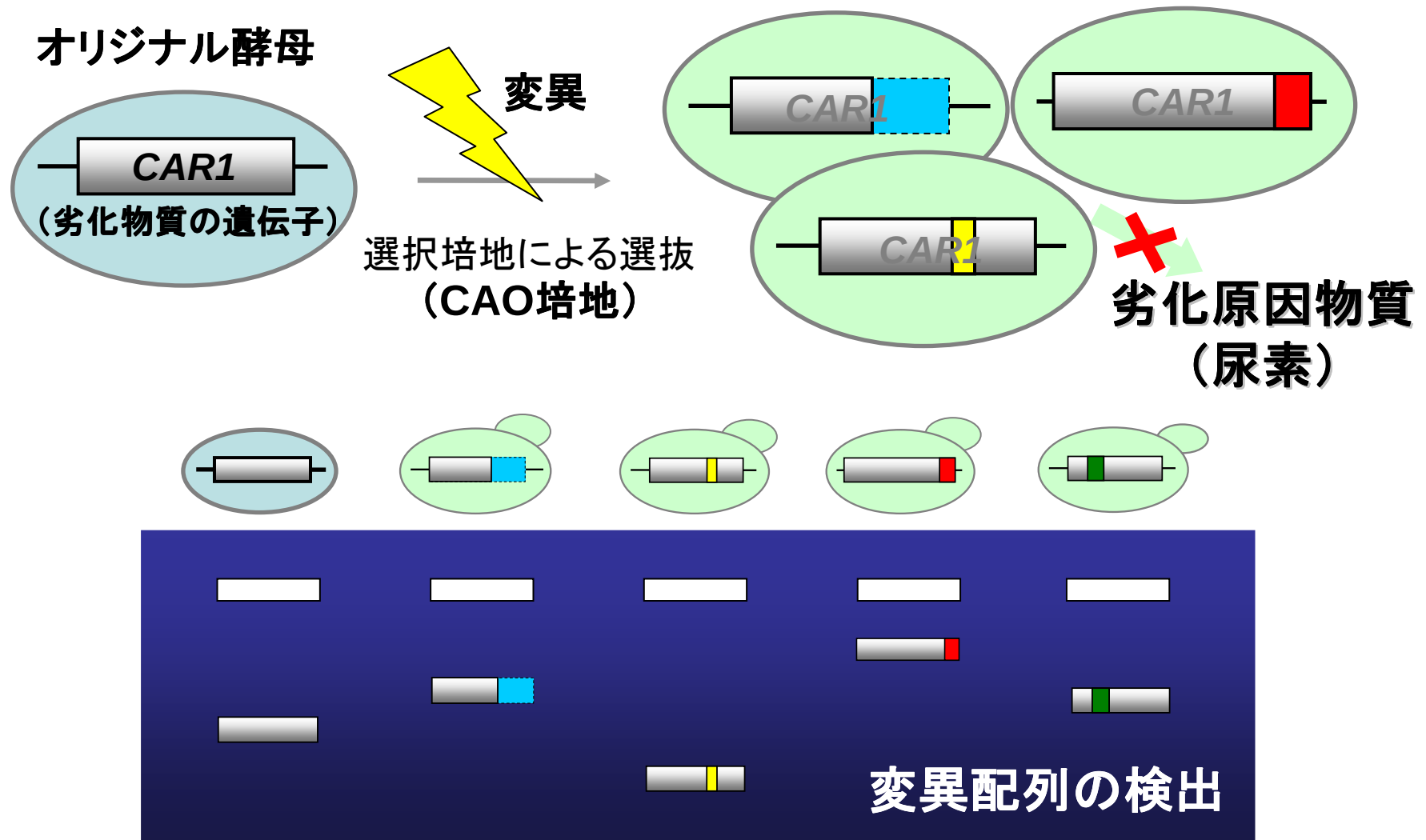
無機成分分析



DNA識別法

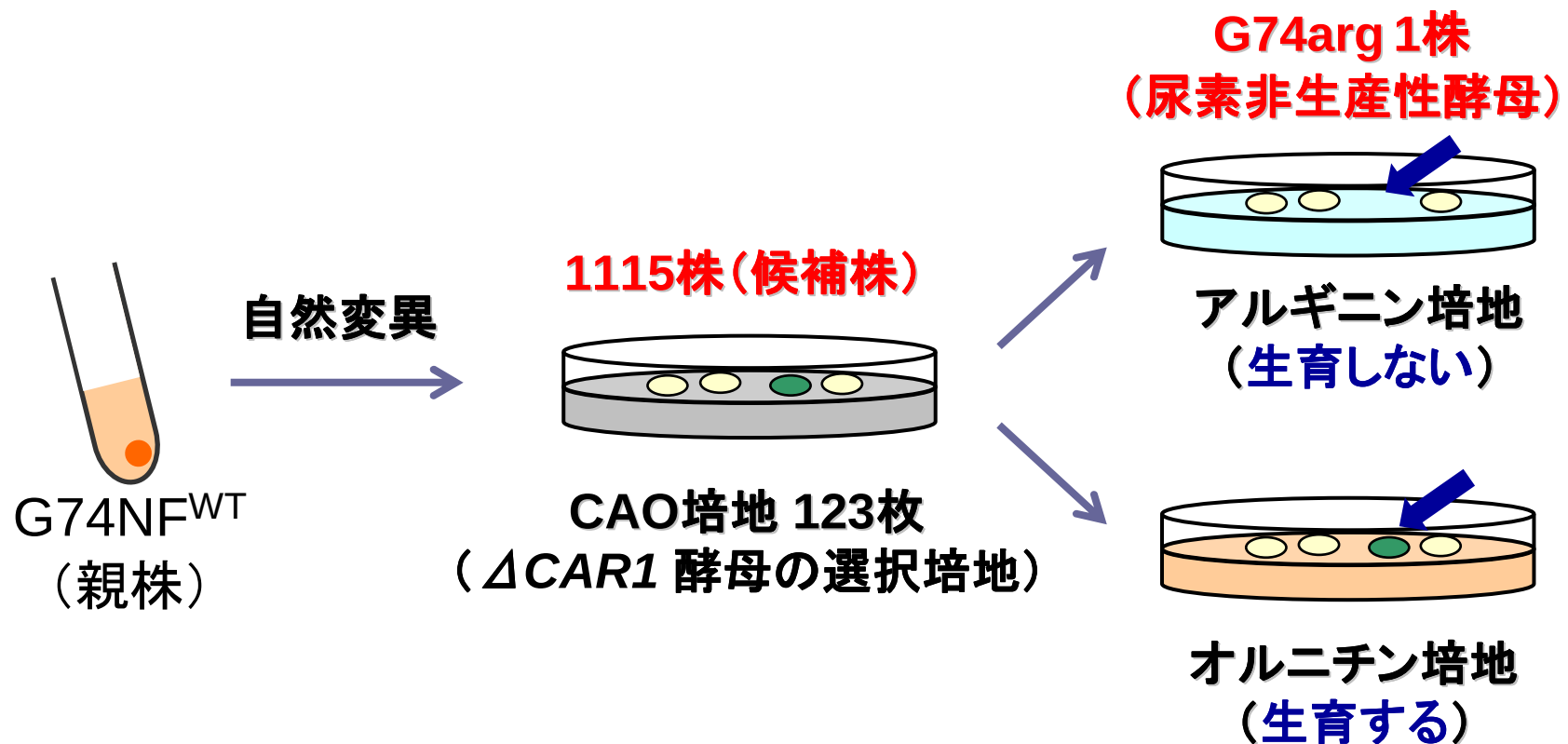
清酒を最も造り易い地域（県）に → 世界の銘醸地“Niigata Sake”へ

劣化物質の原因遺伝子を利用した識別マーカーの開発



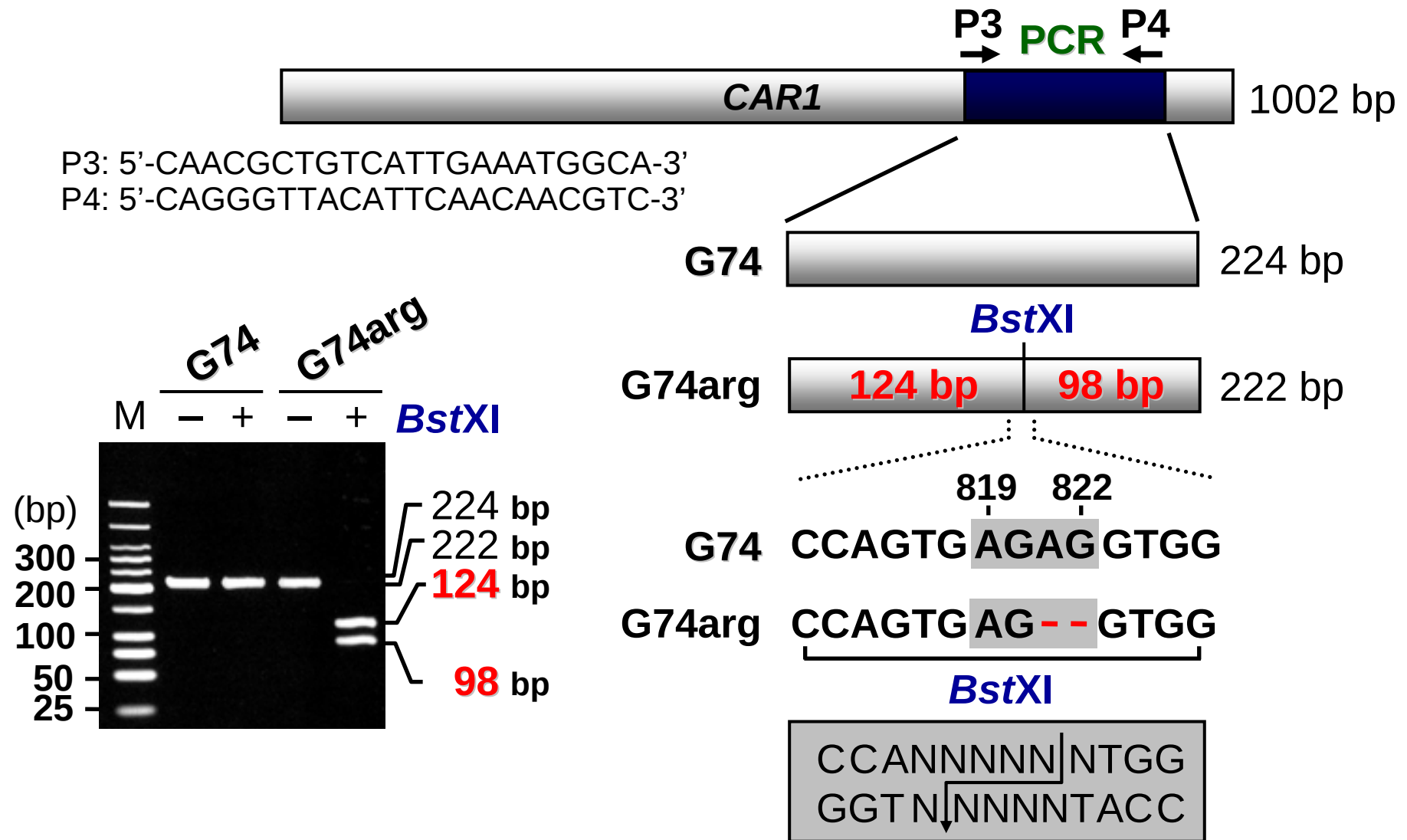
一挙両得! 新潟県酵母の証明と劣化物質の抑制が可能に!!

G74株からの尿素非生産性酵母 (G74arg株) の取得



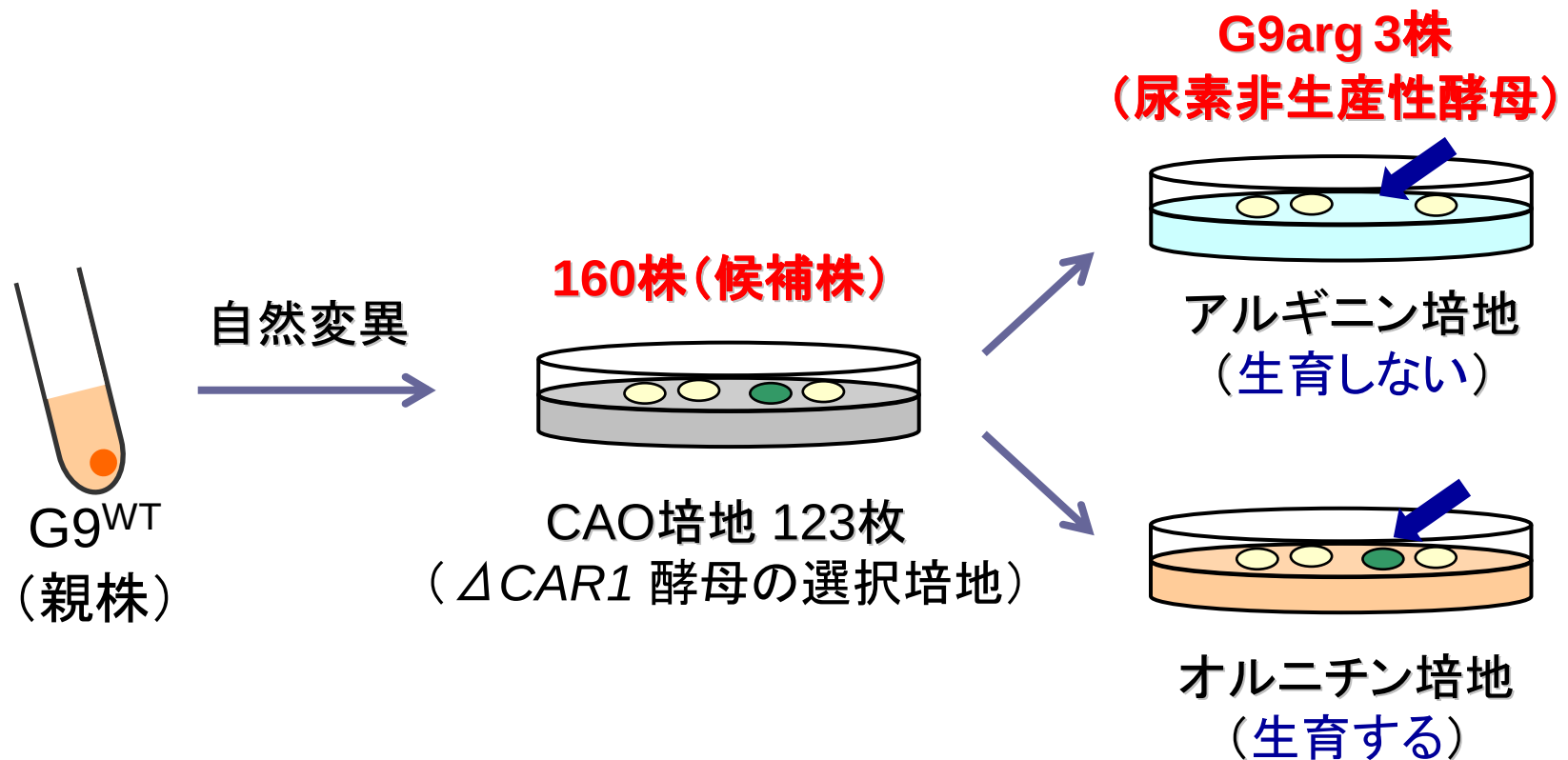
変異処理を施すことなく、尿素非生産性酵母の分離に成功！

G74arg株のCAR1変異部位とPCR-RFLP解析系の構築



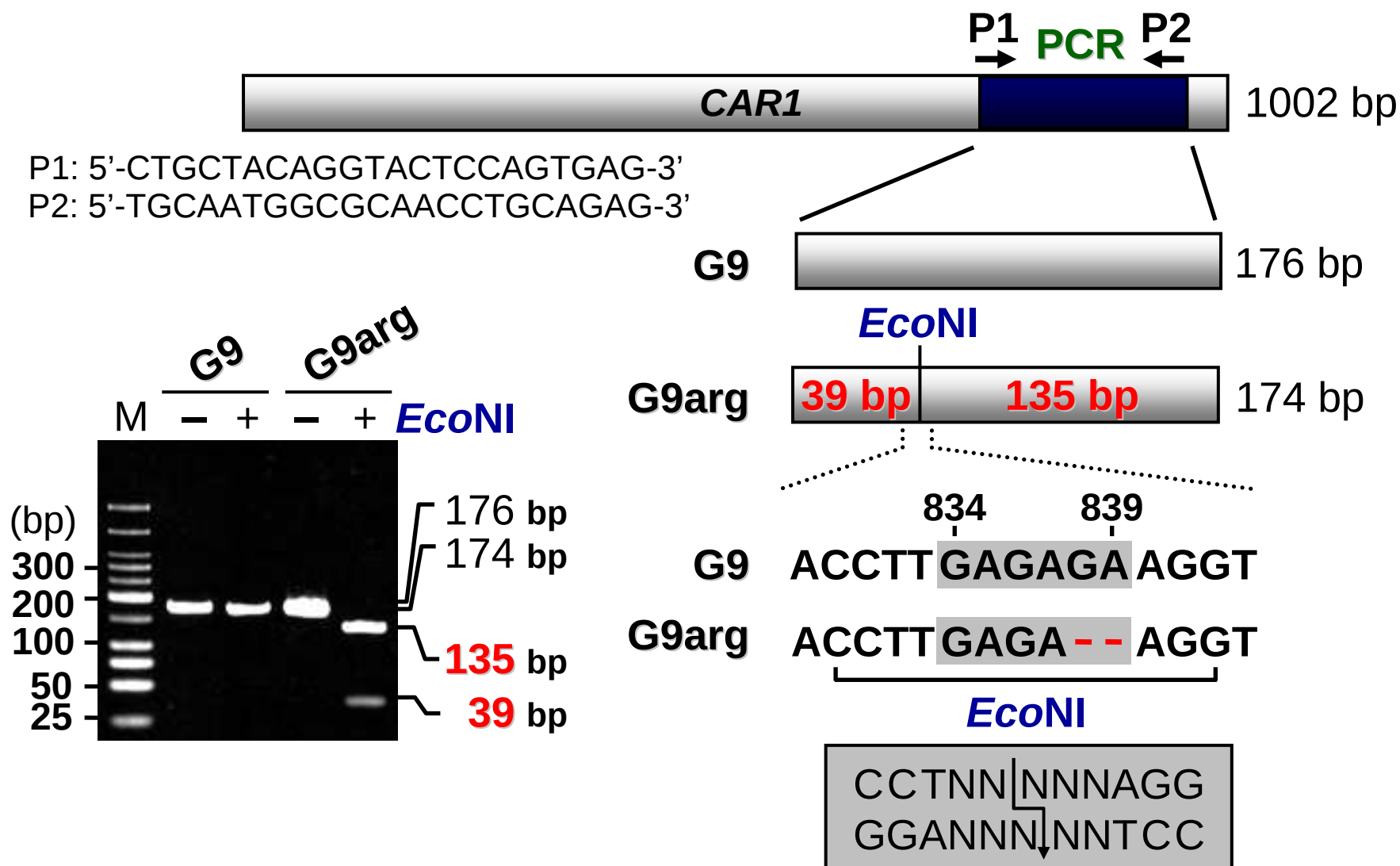
様々な清酒酵母の中から**G74arg**を容易に識別することが可能!

G9株からの尿素非生産性酵母 (G9arg株) の取得



変異処理を施すことなく、尿素非生産性酵母の分離に成功！

G9arg株のCAR1変異部位とPCR-RFLP解析系の構築



様々な清酒酵母の中から**G9arg**を容易に識別することが可能!

酵母DNAを利用した製品識別の操作と分析例

分析操作

MightyAmp PCR (Takara)
(30サイクル, 2時間)

PCR反応液

制限酵素処理 (37°C, 20分)

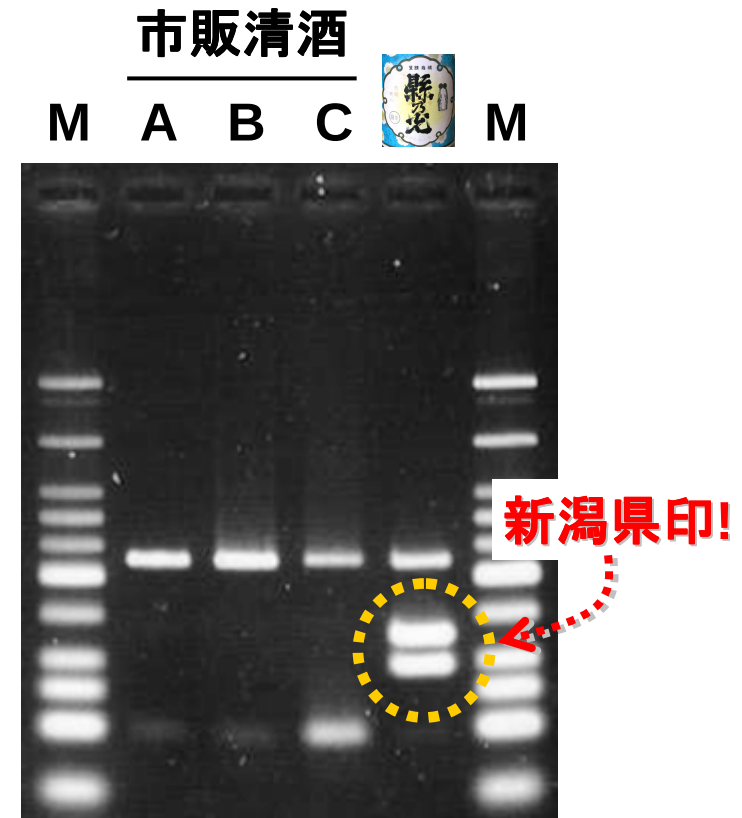
制限酵素処理DNA

電気泳動 (100 V, 40分)

アガロースゲル

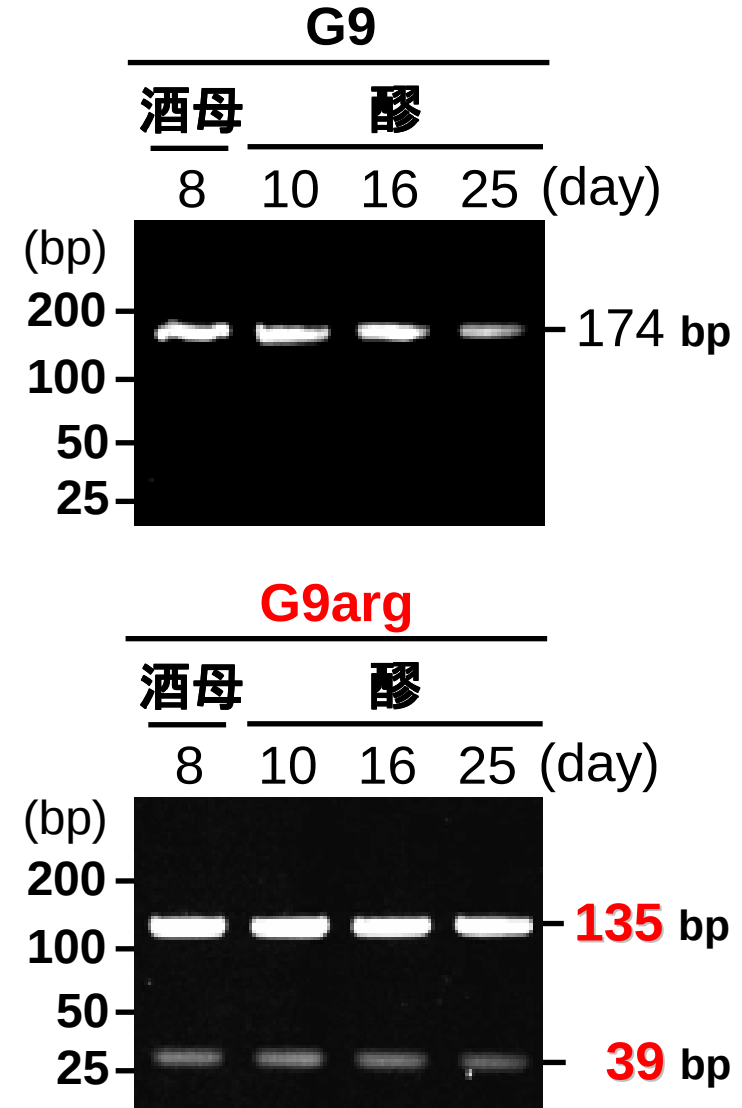
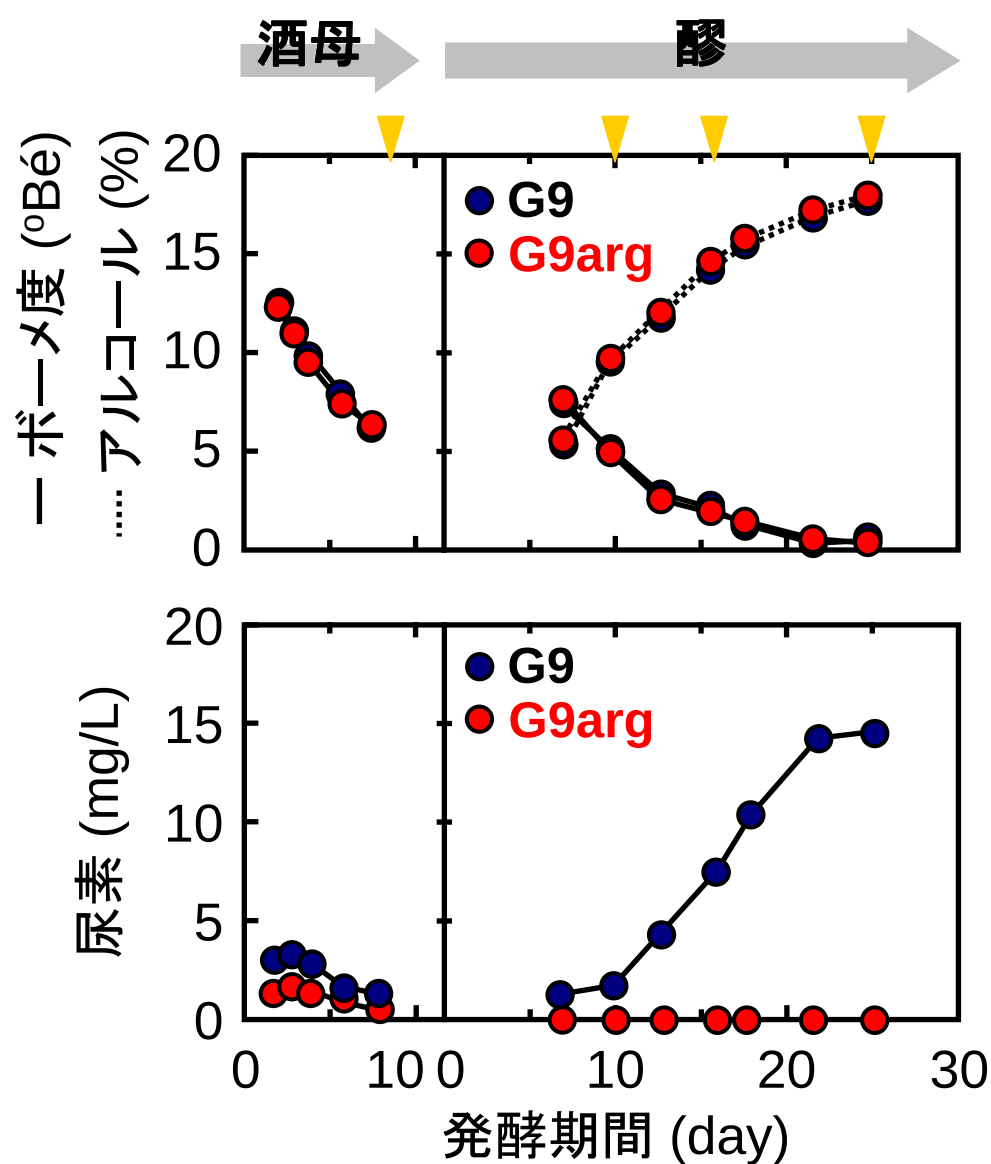
染色後バンドを検出

分析例



新潟県産清酒の信頼性・安全性の向上に大きく貢献!

G9arg株の識別マーカーを用いた酒母・醪中の酵母の識別



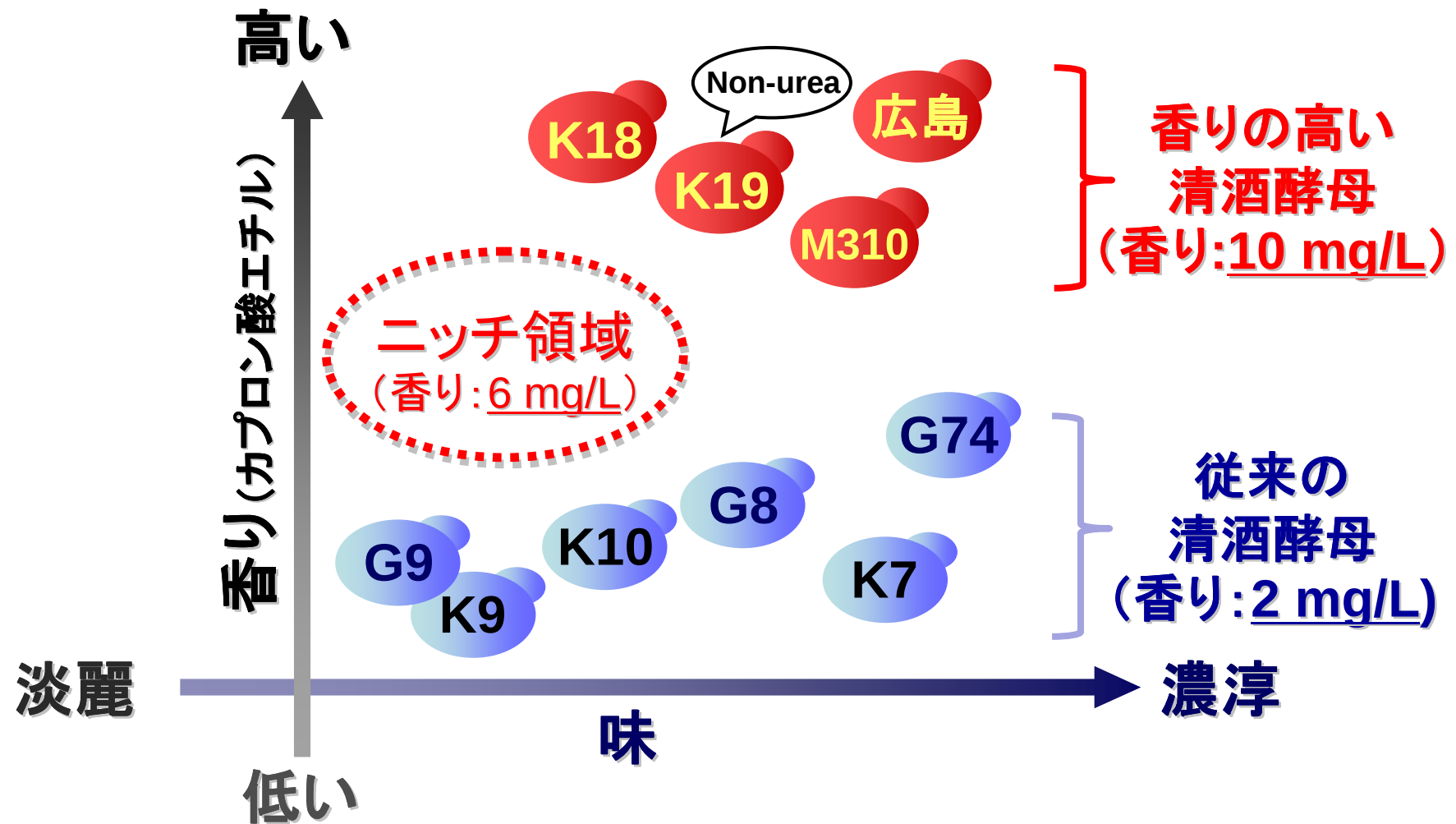
研究1.

- ▶ 酵母識別DNAマーカーを有する尿素非生産性清酒酵母の単離とその応用
(海外輸出に対応した清酒酵母の開発)

研究2.

- ▶ 淡麗な酒質に調和する高香気生産性酵母の開発

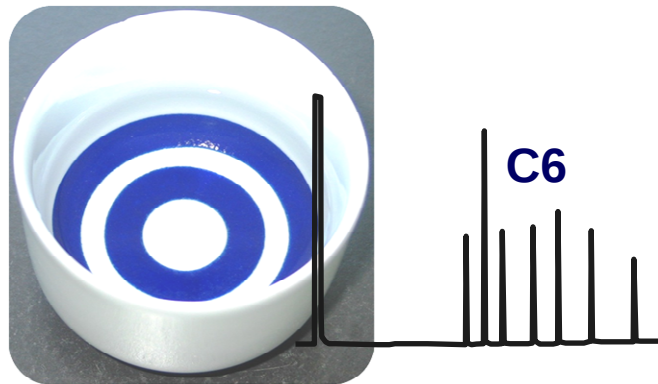
研究背景: 主な清酒酵母の香味の特徴



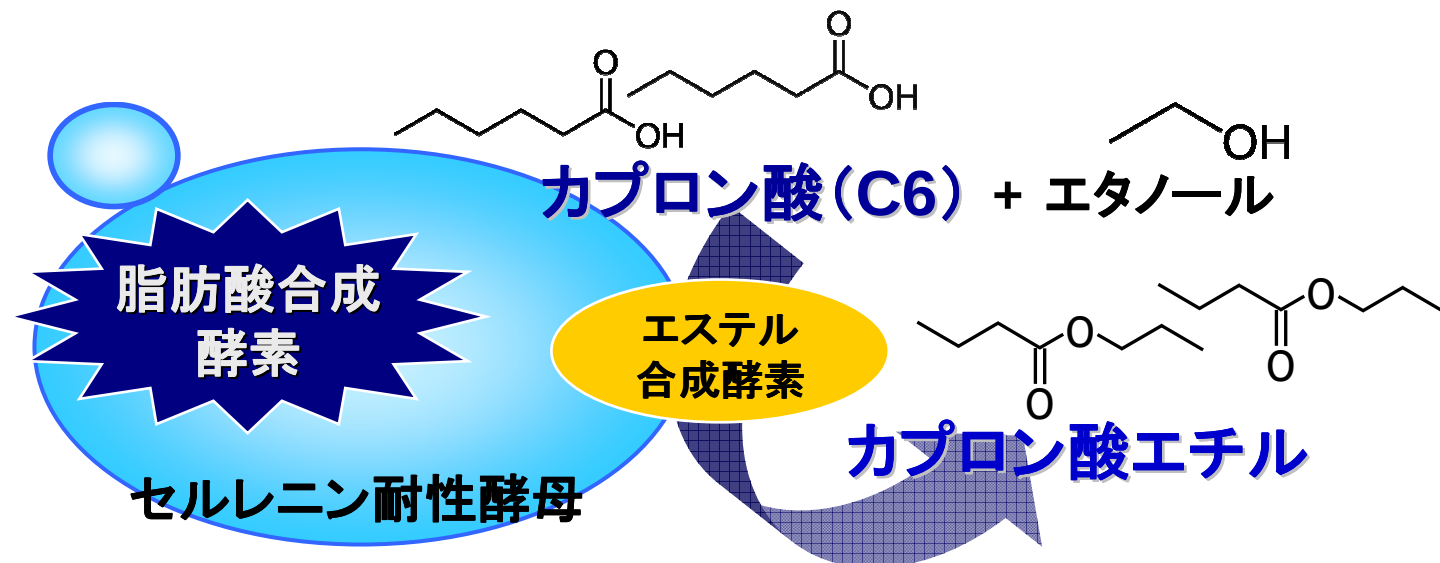
開発目標: 淡麗な酒質に調和する香気高生産性酵母(ニッチ領域)

セルレニン耐性を有するカプロン酸エチル高生産性酵母の カプロン酸エチル生成機構

遊離脂肪酸組成 (C6~C18)
の大部分は**カプロン酸 (C6)**



酵素を利用した
清酒中の遊離脂肪酸の定量



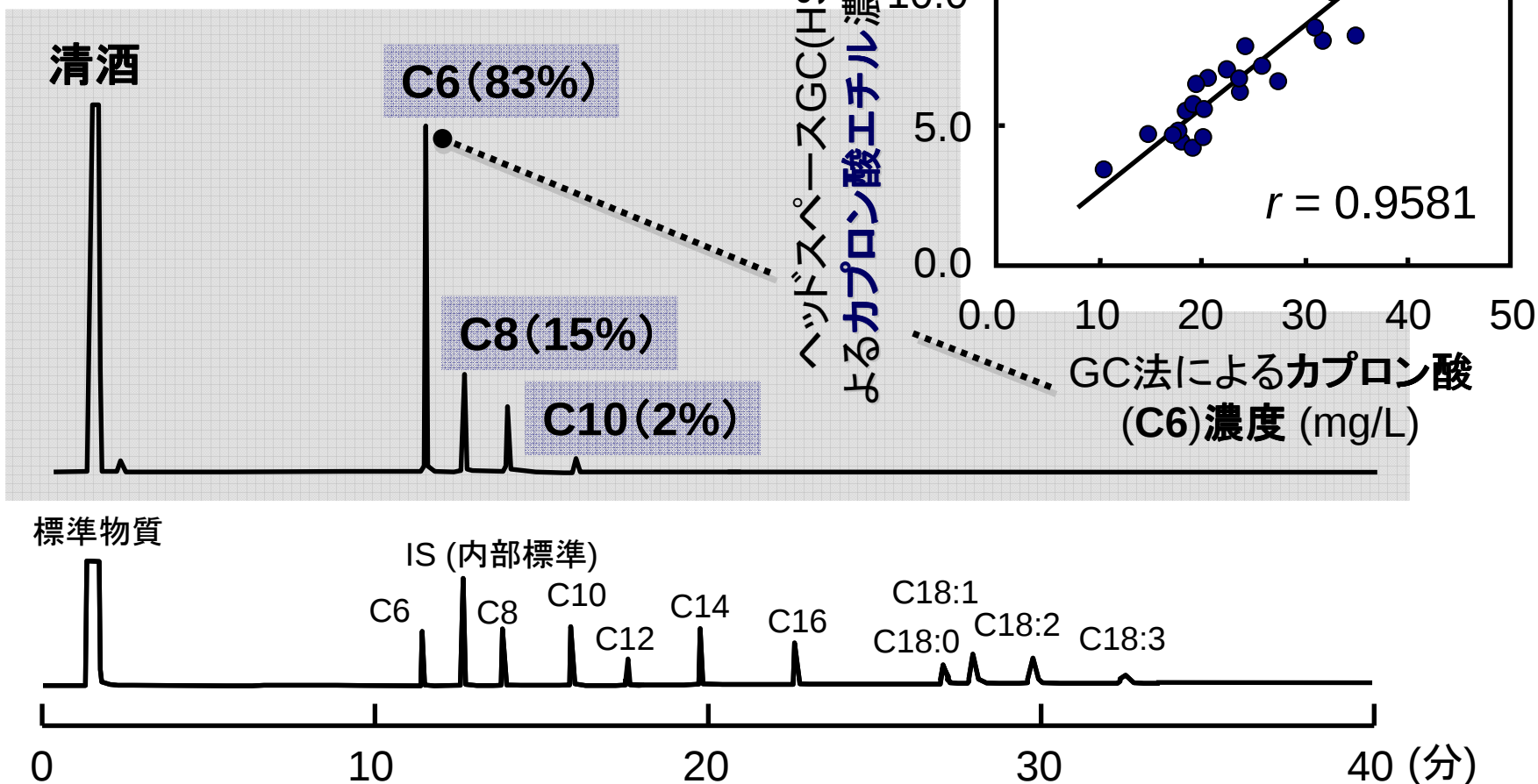
清酒中の遊離脂肪酸(FFA)組成の分析結果

ガスクロマトグラフ(GC)分析

装置: GC-14B (Shimadzu)

カラム: InertCap FFAP (GL Sciences)

検出器: Flame ionization detector



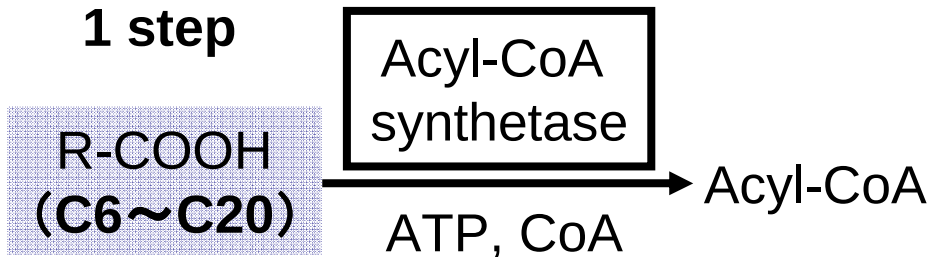
カプロン酸(C6)とカプリル酸(C8)が清酒中の主要な脂肪酸！

酵素を利用した遊離脂肪酸の定量法(酵素法)の 測定原理と検量線

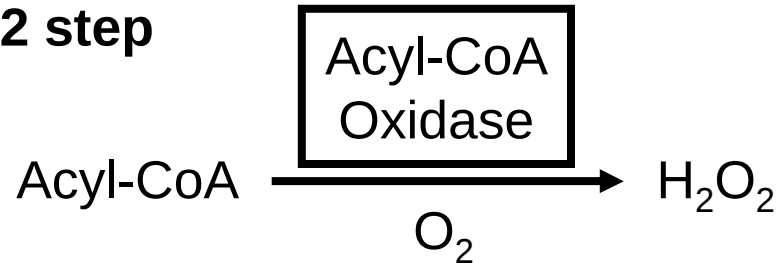
測定原理

(NEFA C-test Wako)

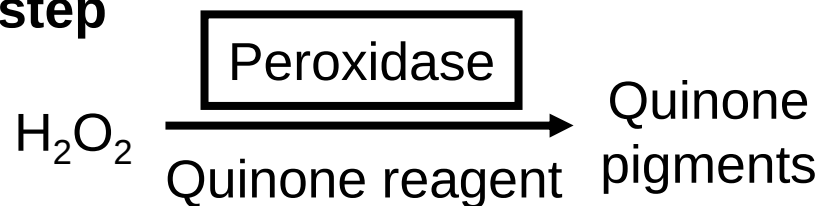
1 step



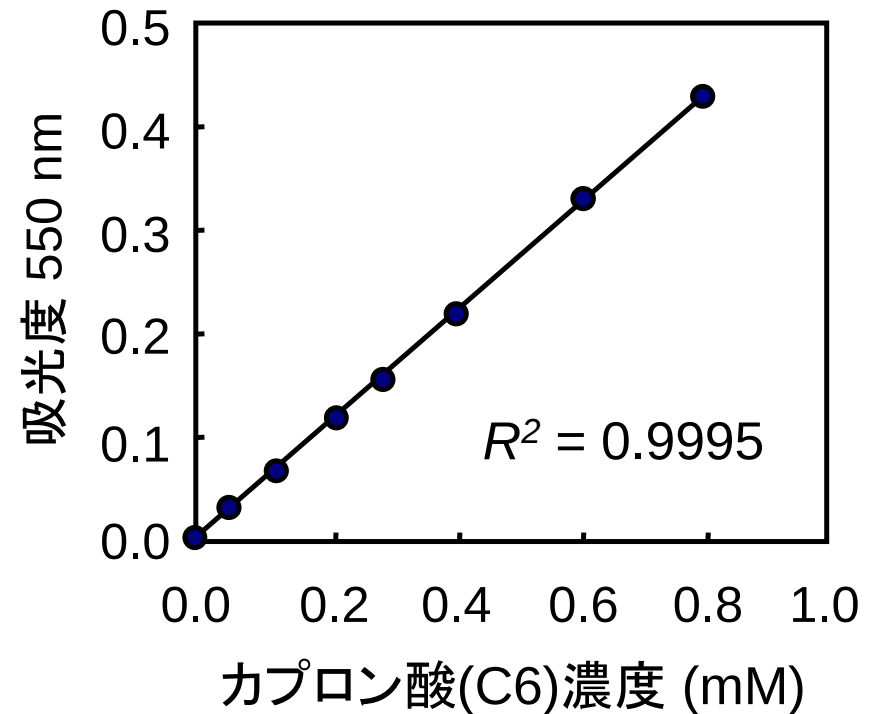
2 step



3 step



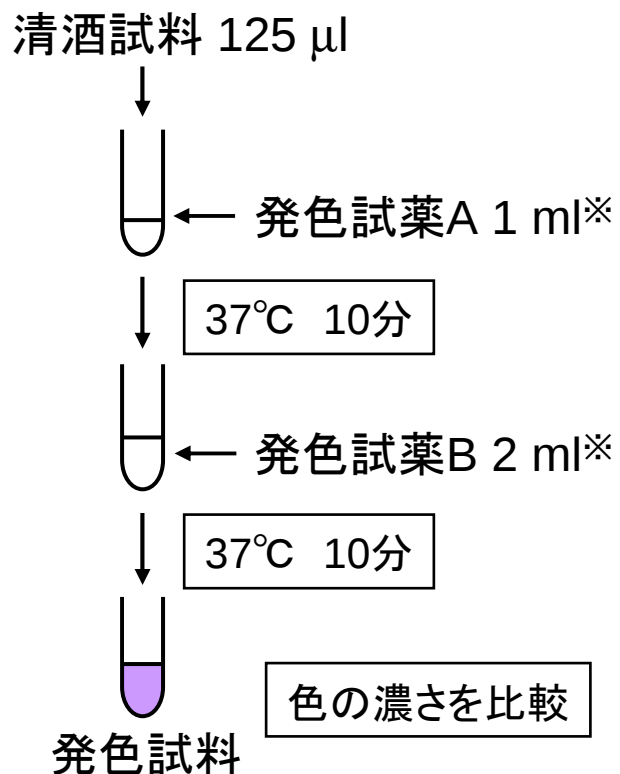
カプロン酸(C6)による検量線



乳酸や酢酸といった**短鎖脂肪酸(C5以下)**は検出されない

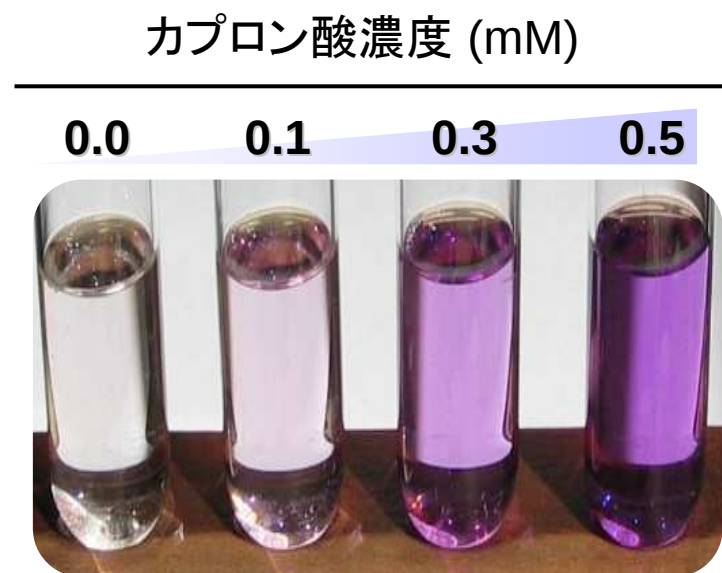
酵素法の分析操作と分析例

分析操作



※遊離脂肪酸測定キットNEFA C-テストワコー
(和光純薬株式会社製)を使用

分析例



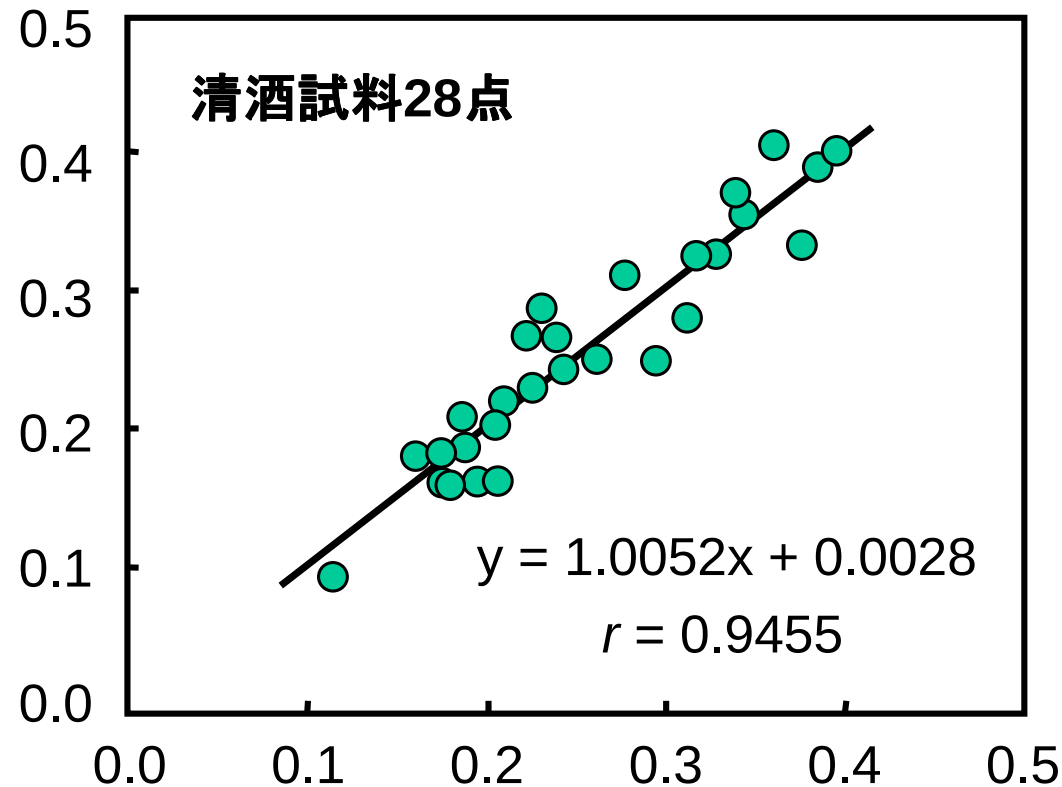
カプロン酸の濃度が高くなるとともに
色が濃くなる

高価な分析機器を必要とせず、**分析操作はわずか20分！**

清酒中のカプロン酸濃度とカプリル酸濃度の和(GC法)と 総遊離脂肪酸濃度(酵素法)の関係

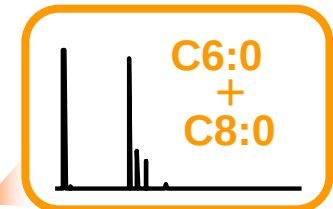


酵素法による総遊離脂肪酸濃度(mM)



GC法による

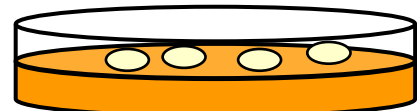
カプロン酸濃度とカプリル酸濃度の和(mM)



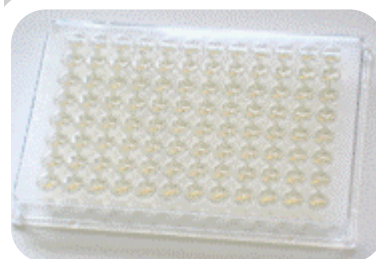
酵素法を用いて清酒中の**中鎖脂肪酸の簡易定量**が可能！

酵素法を利用した香気高生産性酵母の迅速選抜法 (新潟県:特許第5963123号)

新潟清酒酵母G9NF株



セルレニン-YPD
培地

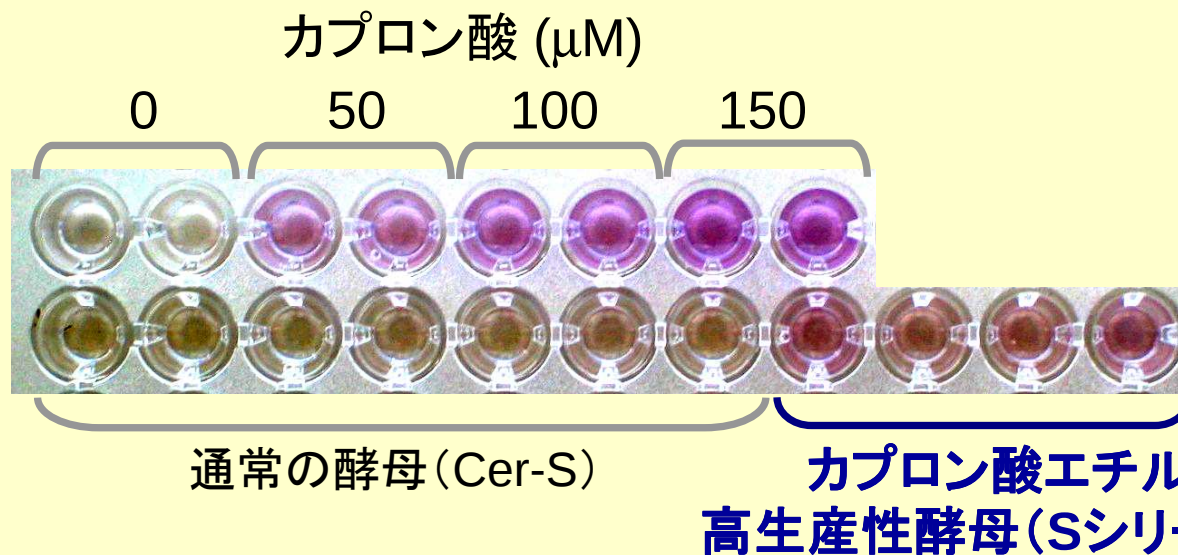


96穴プレートを用いた培養
(YPD培地・30℃・2日間)

酵素法

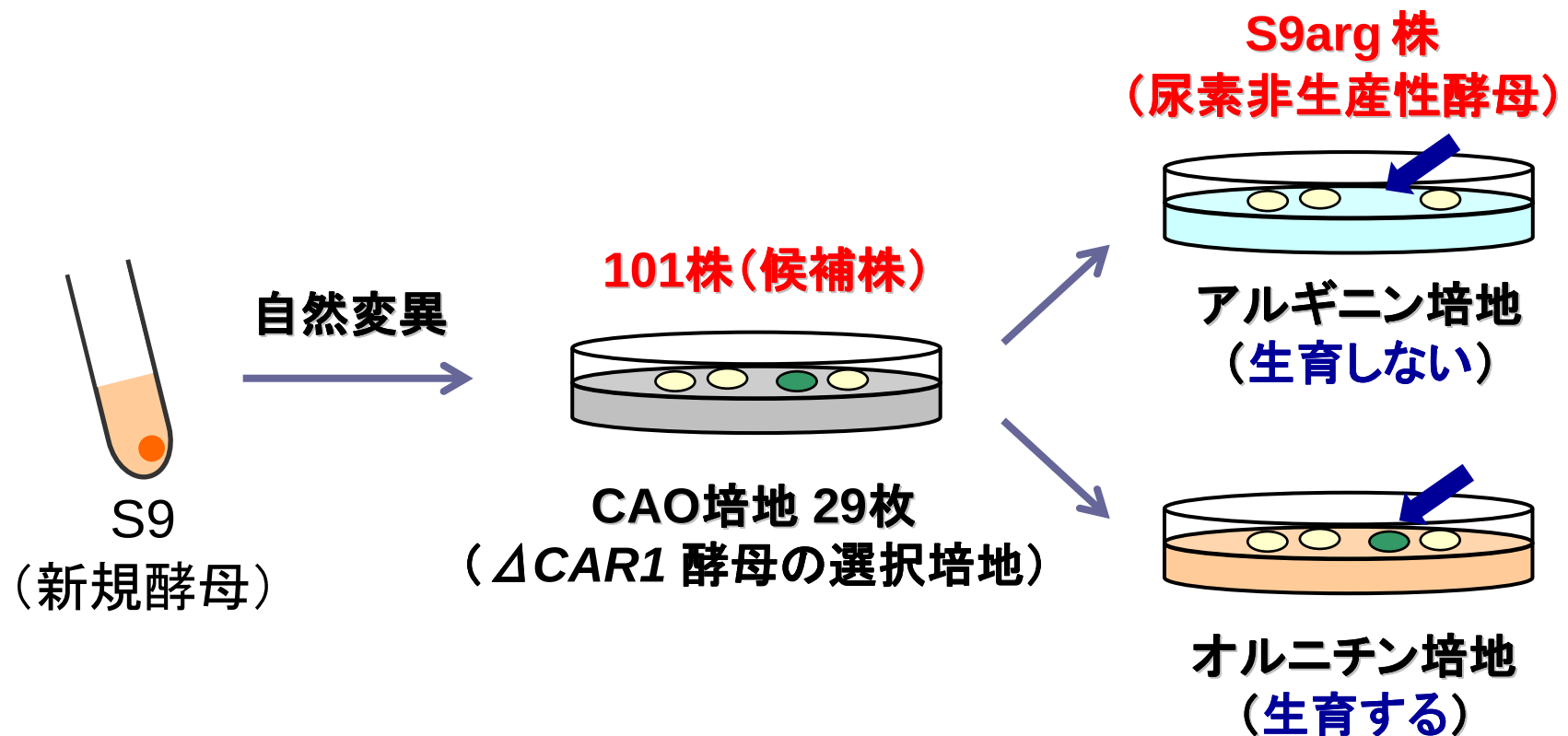


脂肪酸濃度に
応じて培地が発色



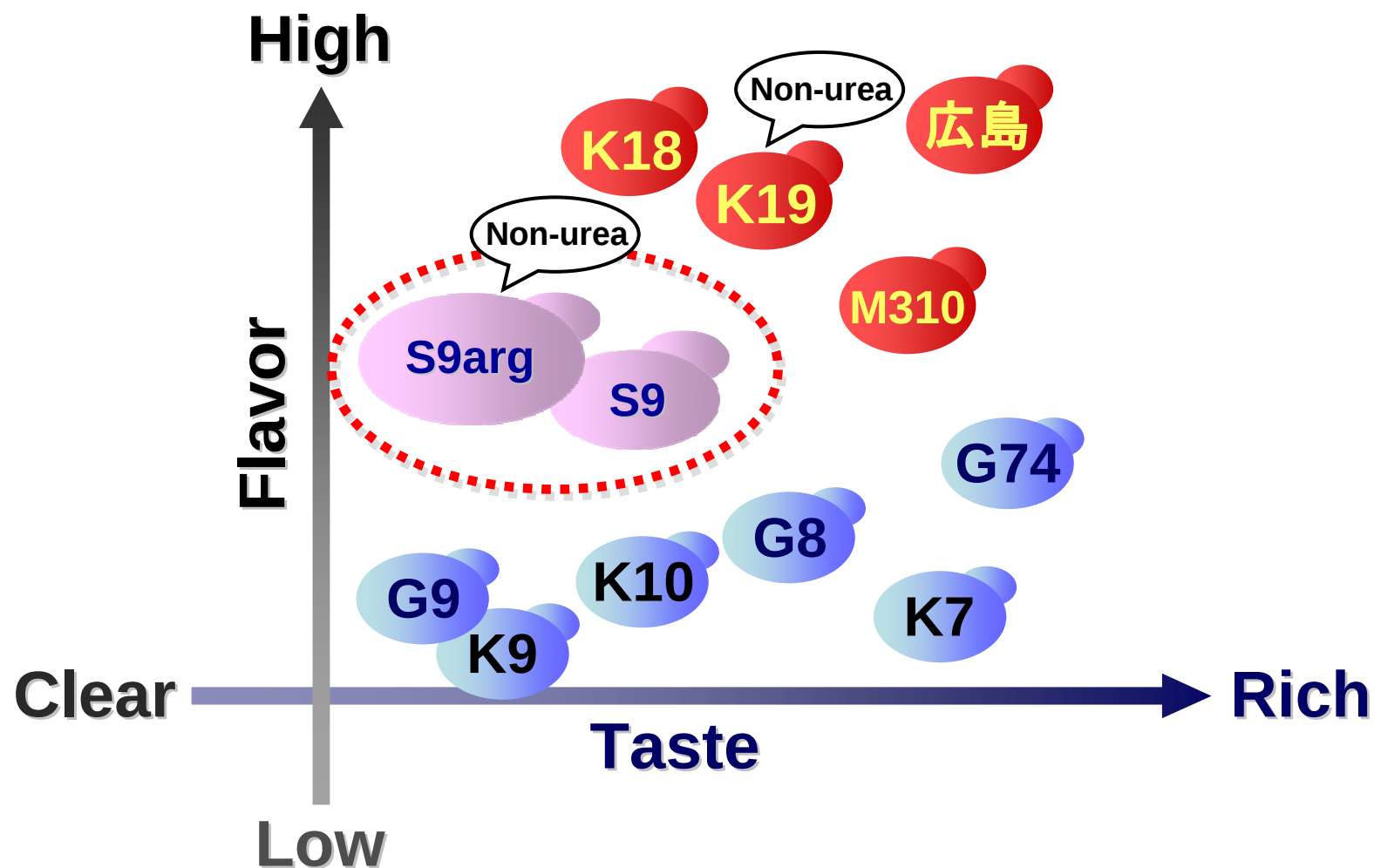
醸造試験場にて**G9NF由来**の香気高生産性酵母(**S9株**)を取得

S9株からの尿素非生産性酵母の取得



高香気生産性＋尿素非生産性を有する**S9arg株**を単離!

淡麗な酒質に調和する香気高生産性酵母の開発に成功!



S9arg株は、新潟県の清酒酵母として**平成28BY**よりラインナップ!

まとめ

アルギナーゼ遺伝子を利用した 酵母識別マーカーを有する清酒酵母の単離に成功!

1. 新規酵母は新潟県の清酒酵母であることの証明が可能
2. 新規酵母の醸造特性は親株と同等で変化はない
3. 製成酒中の尿素(カルバミン酸エチルの前駆体)は不検出
4. 清酒醪や酵母残存製品からも酵母を識別することが可能
5. カプロン酸エチル高生産性酵母の育種にも応用可能

原著論文: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 77, 2505-2509 (2013)

関連特許: 特許第6007426号 清酒の製造方法